

SYSTEME ACELLULAIRE D'INCORPORATION DU 1-¹⁴C-D MANNOSE DANS LES GLYCOPROTEINES D'ASPERGILLUS ORYZAE

M.RICHARD, R.LETOUBLON, P.LOUISOT et R.GOT

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine,
59 Lyon, France*

Received 9 December 1969

The smooth microsomal fractions from *Aspergillus oryzae* were shown to carry out transfer of mannose from GDP-mannose to endogenous proteins acceptors. Data also are presented which support that among the subcellular fractions, only the microsomes are active in the mannose transfer reaction. All of the radioactive material chromatographs with mannose, following acid hydrolysis of microsomal fractions.

1. Introduction

Le problème actuel, dans l'étude de la biosynthèse des glycoprotéines, consiste en l'isolement, la purification et la caractérisation des systèmes enzymatiques responsables du transfert et de la fixation des molécules glucidiques sur la chaîne polypeptidique. Parmi les systèmes cellulaires disponibles, certains champignons, comme *Aspergillus oryzae*, représentent un matériel de type eucaryote assez simple; de plus, ce champignon synthétise des glycanohydrolases [1], en particulier une α -amylase [2] de nature glycoprotéique, contenant du mannose et de la glucosamine [3]. Ces enzymes glycoprotéiques rendent d'ailleurs possible une étude des corrélations existant entre l'acquisition d'une structure et l'acquisition d'une fonction.

Des essais *in vivo* ont confirmé qu'une activité de biosynthèse glycoprotéiniques existait chez *Aspergillus oryzae*. Le but de ce travail est la préparation d'un système acellulaire responsable de l'incorporation du mannose à partir du GDP-mannose, forme coenzymatique active de ce glucide.

2. Méthodes

Aspergillus oryzae (CBS 125.49) est cultivé dans un milieu ajusté à pH 6,5 contenant du saccharose

(8%) du glucose (8%) et du glycérol (4%) comme source de carbone et d'oxygène, du nitrate d'ammonium (0,5%) et des peptones (BD.Meyrieux, 2%) comme source d'azote, du phosphate monopotassique (0,04%), du sulfate de magnésium (0,2%) et du sulfate ferreux (0,0005%) comme sels minéraux.

Après 24 h de culture à 32°C, période correspondant à la phase exponentielle de croissance, le mycélium est recueilli par filtration sur verre fritté, lavé à l'eau distillée et broyé avec un broyeur à billes (diamètre 0,5 mm), dans un tampon tris-HCl 0,05 M, pH 7, 0,25 M en saccharose et 0,05 M en citrate trisodique. Les débris sont éliminés par 15 min de centrifugation à 1000 g et un surnageant postmitochondrial est obtenu après 15 min de centrifugation à 10.000 g. Les 4/5 supérieurs du surnageant sont centrifugés 1 h à 200.000 g; un culot de microsomes est ainsi séparé de la phase cytoplasmique non particulaire.

Les microsomes sont remis en suspension dans le même tampon, à une concentration de 10 mg de protéines, dosées par la méthode de Lowry et al. [4], par ml. Cette suspension est utilisée, d'une part dans les incubations *in vitro*, d'autre part pour le fractionnement par la méthode de Dalner [5]. 6 ml sont amenés à une concentration 0,015 M en CsCl et déposés sur 4 ml de saccharose 1, 3 M, contenant la même concentration en CsCl. Après 2 h 30 min de centrifugation à 226.000 g, on obtient une zone

Tableau 1

Radioactivité incorporée dans les macromolécules glycoprotéiques du surnageant post mitochondrial, de la phase cytoplasmique non particulaire (cell sap), des microsomes, de l'ergastoplasme (rough microsomes), des membranes du réticulum endoplasmique (smooth membranes), des membranes de l'ergastoplasme (rough membranes) et des ribosomes d'*Aspergillus oryzae* après 1 h d'incubation *in vitro*, à 30°C, en présence de GDP-mannose-¹⁴C.

Fractions subcellulaires	Protéine par essai (mg)	Radioactivité totale (cpm)	Radioactivité spécifique (cpm/mg de protéine)
Surnageant post mitochondrial	30	8×10^4	2700
Phase cytoplasmique non particulaire	20	0	0
Microsomes	10	8×10^4	8000
Ergastoplasme	3,1	22000	7000
Membranes du réticulum endoplasmique	1,2	12500	10000
Membranes de l'ergastoplasme	1	0	0
Ribosomes	2	0	0

trouble située à l'interface et un culot de microsomes ("rough microsomes"). Ce culot est suspendu dans le saccharose 0,25 M contenant 1% de désoxycholate de sodium; une centrifugation de 2 h à 144.000 g permet de séparer les ribosomes des membranes de l'ergastoplasme.

Quant à la zone trouble, elle est pipetée et recentrifugée 2 h à 226.000 g après dilution dans le saccharose 0,25 M; un culot de membranes du réticulum endoplasmique ("smooth microsomes") est ainsi obtenu.

Le mélange d'incubation contient, pour un volume total de 240 µl : 200 µl de la fraction subcellulaire étudiée, 2×10^{-6} µmole de GDP-mannose-¹⁴C (guanosine diphosphate mannose [mannose-¹⁴C], (U), NEC, activité spécifique $1,7 \times 10^2$ mCi/mmmole), 5 mM de MnCl₂. Une chasse isotopique est effectuée en ajoutant, soit au temps 0°C, pour les témoins, soit au temps prévu pour les essais, 6×10^{-2} µmole de

GDP-mannose non marqué. Tous les tubes sont incubés à 30°C puis les macromolécules sont précipitées par une concentration finale de 5% en acide trichloracétique sur filtre Whatman (Glass paper, GFB). Les précipités sont lavés sur le filtre par un mélange méthylal/méthanol (4/1).

La radioactivité est déterminée dans un compteur à scintillation liquide Tri-Carb Packard.

Les fractions radioactives sont hydrolysées pendant 3 h à 100°C par HCl 4 N. Après évaporation de l'acide chlorhydrique, l'hydrolysate est chromatographié sur colonne de Dowex 50 X 4 (200-400 mesh) dans HCl 0,3 N. L'effluent est analysé en chromatographie sur couche mince de cellulose MN 300, dans le mélange solvant butanol/pyridine/HCl 0,1 N (5/3/2). Après révélation de témoins non marqués par l'oxalate d'aniline, la poudre de cellulose est prélevée au niveau de chacune des taches et la radioactivité correspondante est comptée.

3. Résultats et discussion

Les résultats provenant de séries d'essais identiques sont résumés dans le tableau 1. L'incorporation mise en évidence dans le surnageant post-mitochondrial se localise exclusivement au niveau des microsomes.

La chromatographie effectuée sur l'hydrolysate de microsomes marqués montre que la radioactivité ne se trouve que sur le mannose. C'est donc dans cette fraction subcellulaire que se situe le système enzymatique capable de transférer le mannose, à partir du GDP-mannose, à un accepteur endogène.

La méthode de Dallner permet de préciser la distribution de la mannosyltransférase dans les fractions submicrosomiques: c'est dans les membranes du réticulum endoplasmique (smooth microsomes), que se trouve la radioactivité spécifique la plus élevée. Le fractionnement de l'ergastoplasme (rough microsomes), qui contient encore les $\frac{2}{3}$ de la radioactivité, en ribosomes et membranes de l'ergastoplasme (rough membranes) s'est avéré infructueux puisqu'aucune activité ne subsiste dans les deux fractions obtenues. Il faut noter que le fractionnement direct des microsomes, à l'aide du désoxycholate de sodium, en ribosomes et en membranes conduisait également à un résultat négatif.

Il semble donc que, contrairement à certains

systèmes dont l'activité est accrue par la présence d'un détergent comme le triton X-100 [6-8], l'intégrité de la structure membranaire soit indispensable au maintien de l'activité de transfert.

Enfin, des essais identiques d'incorporations effectuées à partir de l'UDP-galactose n'ont pas permis de mettre en évidence une activité galactosyltransférase. On pourrait donc supposer que les glycoprotéines synthétisées par *Aspergillus oryzae* contiennent, comme l' α -amylase, peu ou pas de galactose dans leurs chaînes polysaccharidiques.

En conclusion, l'incorporation de mannose- ^{14}C par un système acellulaire préparé à partir d'*Aspergillus oryzae* montre que la mannosyltransférase est à localisation strictement membranaire; ce résultat est en accord avec ceux obtenus récemment dans la thyroïde de mouton [6] ou le foie de rat [7, 8], pour des galactosyl et *N*-acétyl-hexosaminyl-transférases.

Références

- [1] H.Hanafusa, T.Ikenaka et S.Akabori, J. Biochem. 42 (1955) 55.
- [2] M.Anai, T.Ikenaka et Y.Matsushima, J. Biochem. 59 (1966) 57.
- [3] H.Yamaguchi, T.Ikenaka et Y.Matsushima, J. Biochem. 65 (1969) 793.
- [4] O.H.Lowry, N.I.Rosebrough, A.L.Farr et R.J.Randall, J. Biol. Chem. 193 (1951) 265.
- [5] G.Dallner, Acta Pathol. Microbiol. Scand. suppl. 166 (1963).
- [6] S.Bouchilloux, M.Ferran, J.Grégoire et O.Chabaud, Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 (1969) 538.
- [7] J.Molnar, M.Tetas et H.Chao, Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 (1969) 684.
- [8] D.J.Morre, L.M.Merlin et T.W.Keenan, Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 (1969) 813.